

MegaELISA[®] FIV ad us. vet.

**Enzymimmunoassay zum qualitativen Nachweis von
Antikörpern gegen das Feline Immunschwäche-Virus
(FIV) im Plasma oder Serum der Katze**

In vitro Diagnostikum

GEBRAUCHSINFORMATION

**Enzyme immunoassay for the qualitative detection
of antibodies against the Feline Immunodeficiency
Virus (FIV) in plasma or serum of the cat**

In vitro diagnosticum

INSTRUCTIONS FOR USE

Art. No. 804096EK1 (96's)

Hersteller/Manufacturer:



Lochauer Str. 2
A-6912 Hörbranz – AUSTRIA
☎ (+43) 5573 85400
📠 (+43) 5573 85400-4
✉ info@megacor.at
🌐 www.megacor.com

MegaELISA® FIV ad us. vet.

| Inhaltsverzeichnis | Seite |
|---|-------|
| 1. Einleitung | 3 |
| 2. Verwendungszweck | 3 |
| 3. Testprinzip | 3 |
| 4. Testkitkomponenten | 4 |
| 5. Haltbarkeit und Lagerung | 5 |
| 6. Informationen zum Probenmaterial | 5 |
| 7. Testvorbereitung | 6 |
| 8. Testdurchführung | 7 |
| 9. Testauswertung | 8 |
| 10. Leistungsmerkmale | 9 |
| 11. Sicherheitsmaßnahmen und Warnhinweise | 10 |
| 12. Haftung | 11 |
| 13. Kurz-Protokoll MegaELISA® FIV | 12 |
| Abkürzungen | 2 |

| Contents | Page |
|--|------|
| 1. Introduction | 13 |
| 2. Intended use | 13 |
| 3. Test principle | 13 |
| 4. Test-kit components | 14 |
| 5. Stability and Storage | 15 |
| 6. Information on the sample material | 15 |
| 7. Test preparation | 16 |
| 8. Test procedure | 17 |
| 9. Test evaluation | 18 |
| 10. Features of performance | 19 |
| 11. Safety measures and precautions | 19 |
| 12. Liability | 20 |
| 13. Short protocol MegaELISA® FIV | 21 |
| Abbreviations | 2 |

Abkürzungen / Abbreviations

- H₂O₂ Wasserstoffperoxid / Hydrogen peroxide

1. EINLEITUNG

Das Feline erworbene Immunschwächesyndrom (Felines AIDS) wird durch das Feline Immunschwächevirus (FIV) verursacht und ist weltweit bei Feliden verbreitet. Die Prävalenzen können in Abhängigkeit von den Haltungsbedingungen (v. a. Streuner, Freigängerkatzen) stark variieren: von 2–3 % in Deutschland bis hin zu über 30 % in Italien und 44 % in Japan.

Die Übertragung von FIV-haltigen Körperflüssigkeiten, Blut oder Blutbestandteilen erfolgt i. d. R. parenteral (durch Bissverletzungen, Bluttransfusionen, Deckakt mit nachfolgendem Nackenbiss) sowie transplazentar und perinatal in das Blut gesunder Katzen. Freilaufende Kater mit starkem Territorialverhalten gelten als „Risikotiere“ und sind daher signifikant häufiger infiziert als Kätzinnen.

Die Initialphase der Infektion (vergrößerte Lymphknoten, Fieber, Neutropenie etc.) bleibt klinisch meist unbemerkt. Dieser folgt oft eine jahrelang andauernde, symptomlose Latenzphase. Erst in der sich daran anschließenden Phase zeigen sich unspezifische klinische Symptome, die in erster Linie durch die mannigfaltigen Sekundärsymptome (z. B. Stomatitis, Tumorerkrankungen, entzündliche Augenveränderungen, Anämie und Leukopenie), weniger durch das Virus selbst (z. B. neurologische Symptome, Lymphome) verursacht werden.

Aufgrund der relativ symptomlosen Initialphase, der symptomlosen Latenzphase und der Tatsache, dass ca. 95 % der FIV-infizierten Katzen ab 4 Wochen post infectionem hohe FIV-Antikörperkonzentrationen im Blut aufweisen, spielt der Nachweis von FIV-Antikörpern als Routinediagnostik der Wahl eine entscheidende Rolle in der Diagnose einer potentiellen FIV-Infektion.

Auf Basis hochspezifischer, synthetischer FIV-Antigene ist der **MegaELISA® FIV** ein wichtiger diagnostischer Baustein zur Abklärung klinischer sowie anamnestischer FIV-Verdachtsfälle.

2. VERWENDUNGSZWECK

Der **MegaELISA® FIV** ist ein Enzymimmunoassay zum qualitativen Nachweis von Antikörpern gegen das Feline Immunschwäche-Virus (FIV) im Plasma oder Serum der Katze.

3. TESTPRINZIP

Der **MegaELISA® FIV** ist ein qualitativer Immunoassay-Nachweis von Antikörpern gegen das Feline Immunschwäche-Virus (FIV) im Sandwich-Prinzip.

An der Oberfläche der Vertiefungen der Mikrotiterplatte sind synthetische FIV-Antigene gebunden. Eine Verdünnung des zu untersuchenden Plasma oder Serums bzw. die Kontrollen werden zur Inkubation bei Raumtemperatur (20–25°C) in die Vertiefung der Mikrotiterplatte pipettiert. Nach einem Waschschrift wird Anti-Katze-Konjugat, markiert mit Meerrettich-Peroxidase (HRP), dazugegeben und bei Raumtemperatur (20–25°C) inkubiert. Nicht gebundenes Konjugat wird in einem weiteren Waschschrift entfernt.

Nach der Zugabe von Substrat (Tetramethylbenzidin, TMB) wandelt gebundenes Enzym bei positiven Proben die farblose Lösung in den Vertiefungen der Mikrotiterplatte in eine blaue Lösung um. Durch Zugabe von Stopp-Reagenz (Schwefelsäure) erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die Extinktion der gelben Lösung in der Mikrotiterplatte ist proportional zur Konzentration der in der Probe vorhandenen Antikörper gegen FIV.

4. TESTKITKOMPONENTEN

4.1. MITGELIEFERTE TESTKITKOMPONENTEN / REAGENZIEN

Die Reagenzien einer Packung reichen für 96 Bestimmungen.

1. **Mikrotiterplatte mit 96 Bestimmungen** (12 teilbare Streifen mit je 8 Bestimmungen, im Halterahmen), beschichtet mit synthetischen FIV-Antigenen
2. **100 ml Probenverdünnungspuffer PVP**, gebrauchsfertig, **lila Kappe**
3. **60 ml Waschpuffer (10×)**, **blaue Kappe**
4. **4 ml Positivkontrolle**, gebrauchsfertig, **durchsichtige Kappe mit rotem Punkt**
5. **4 ml Negativkontrolle**, gebrauchsfertig, **durchsichtige Kappe mit blauem Punkt**
6. **15 ml Konjugat** (Peroxidase-konjugierte Anti-Katze-Antikörper), gebrauchsfertig, **blaue Kappe**
7. **15 ml Substrat** (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin [TMB]/Wasserstoffperoxid [H₂O₂]), gebrauchsfertig, braune Flasche, **braune Kappe. Nicht dem direkten Sonnenlicht aussetzen!**
8. **15 ml Stopp-Reagenz** (0,2 M Schwefelsäure), gebrauchsfertig, **weiße Kappe**
9. **1 Evaluationsblatt**
10. **1 Abdeckfolie**
11. **1 Gebrauchsinformation**

4.2. ERFORDERLICHE, NICHT MITGELIEFERTE REAGENZIEN / ZUBEHÖR

- Destilliertes oder deionisiertes Wasser
- Vortex-Mixer
- Filterpapier/Labortücher
- Messzylinder (1000 ml)
- Stoppuhr
- Waschautomat für Mikrotiterplatten oder Mehrkanalpipette (300 µl)
- Photometer für Mikrotiterplatten (450 nm, evtl. Referenzfilter 620 nm)
- Abfallbehälter mit einer 0,5%-igen Hypochloritlösung

5. HALTBARKEIT UND LAGERUNG



Lagerung
2–8°C



Verwendbar bis
– siehe Etikett



Für den tierärztlichen
Gebrauch



Chargen-Bezeichnung



In vitro Diagnostikum



Keine Reagenzien
verschiedener Testkits,
Chargennummern oder
mit abgelaufenem Ver-
fallsdatum verwenden.



Gebrauchsinformation
genau beachten

Mikrobielle Kontamination der Reagenzien ist zu vermeiden. Nach Erreichen des Verfallsdatums kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.

Die benötigte Anzahl an Mikrotiterstreifen entnehmen, die restlichen sofort wieder in den beigelegten Beutel geben, verschließen und bei 2–8°C lagern.

Eine direkte Lichteinwirkung auf das Substrat ist unbedingt zu vermeiden, um einer Zersetzung bzw. Blaufärbung durch Autooxidation vorzubeugen. Bei aufgetretener Blaufärbung kann das Substrat nicht mehr verwendet werden (Funktionsunfähigkeit)!

6. INFORMATIONEN ZUM PROBENMATERIAL

- Nur Katzen-Plasma oder Serum verwenden!
- Das Probenmaterial vor der Verwendung gut homogenisieren!
- Ungekühlt (**20–25°C**) sollte das Plasma oder Serum innerhalb von 4 Stunden getestet werden! Bei **2–8°C** kann das Plasma oder Serum bis max. 5 Tage gelagert werden. Plasma- oder Serumproben können aliquotiert und dauerhaft bei mindestens –20°C aufbewahrt werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen vermeiden.
- Einige lipämische oder hämolytische Proben können eine Hintergrundfärbung verursachen. Sollte dies der Fall sein, wird empfohlen, den Test mit Proben höherer Qualität durchzuführen.
- Beachten Sie, dass das Probenmaterial, ebenso wie alle verwendeten Testkitkomponenten, zum Zeitpunkt der Anwendung Raumtemperatur haben sollte.
- **ACHTUNG:** Unvollständig gefüllte und/oder unzureichend durchmischte EDTA-, Citrat- oder Heparinröhrchen können Störeffekte verursachen, die zu unterschiedlichen Testergebnissen führen können.

7. TESTVORBEREITUNG

! Gebrauchsinformation vor Durchführung des Tests sorgfältig lesen. Für die Zuverlässigkeit der Ergebnisse ist es notwendig, die Gebrauchsinformation genau zu befolgen. Den Test in der angegebenen Reihenfolge und ohne Verzögerung durchführen. Für jeden Pipettierschritt saubere Einmalspitzen verwenden.

7.1. ALLGEMEINES

- Die Mikrotiterstreifen sind erst nach Erreichen der Raumtemperatur der Verpackung zu entnehmen. Zur Vermeidung von Verdunstungsverlusten empfiehlt es sich, diese abzudecken oder abzukleben.
- Die Reagenzien sind unmittelbar vor ihrer Verwendung gut zu vermischen.
- Nach Gebrauch sind sowohl die nicht verwendeten Mikrotiterstreifen im beigelegten Kunststoffbeutel als auch die Reagenzien wieder bei 2–8°C zu lagern.
- Einmal benutzte Mikrotiterstreifen dürfen nicht wiederverwendet werden.
- Beschädigte Testkitkomponenten dürfen nicht verwendet werden.
- Ein direkter Kontakt von Proben mit den Testkitkomponenten ist zu vermeiden (Kreuzkontamination).
- Direkte Sonneneinstrahlung während der Testdurchführung vermeiden.

7.2. HERSTELLUNG DES WASCHPUFFERS 1:10

1 Teil (60 ml) des Waschpufferkonzentrates wird mit 9 Teilen (540 ml) destilliertem Wasser gemischt. Sollten im Waschpufferkonzentrat Kristalle zu sehen sein, lösen Sie diese durch Erwärmen des Waschpufferkonzentrates im Wasserbad bei 37°C auf. Der verdünnte Puffer kann bei 2–8°C gelagert werden.

7.3. PROBENVORBEREITUNG / PROBENVERDÜNNUNG 1:200 ODER 1+199

- Die zu untersuchenden Proben werden zu Beginn 1:200 mit Probenverdünnungspuffer (PVP) verdünnt (z. B. 5 µl Probe + 995 µl PVP).
- Homogenisieren Sie die Proben-Puffer-Mischung (PPM) gut (mehrmaliges Mischen mit der Pipette oder auf einem Vortex-Mixer).
- **ACHTUNG:** Bei Verwendung eines ELISA-Waschautomaten muss die Probe partikelfrei sein! Um dies zu gewährleisten, zentrifugieren Sie bitte die Probe bei 5000 rpm für 5 Minuten.
- Für die Titration der Proben sollte die serielle Verdünnung bei einer Verdünnung von 1:200 beginnen.
- Die Kontrollen sind gebrauchsfertig und müssen nicht verdünnt werden!

8. TESTDURCHFÜHRUNG

- Probenmaterial (PPM) und Konjugat vor der Verwendung gut homogenisieren!
- Vor Testbeginn auf dem mitgelieferten Ergebnisblatt die Position der Patientenproben und der Standards/Kontrollen auf den Mikrotiterstreifen genau festlegen. Mindestens Doppelbestimmungen werden empfohlen.
- Für jeden Pipettierschritt saubere Einmalspitzen verwenden.

8.1. PROBENAUFTRAG UND ERSTE INKUBATION

- Stecken Sie die benötigte Anzahl an Mikrotiterstreifen in den Halterahmen.
- Geben Sie jeweils
 - 100 µl **Positivkontrolle (2×)**
 - 100 µl **Negativkontrolle (2×)**
 - 100 µl **verdünnte Probe / PPM (2×)**in der gewünschten Reihenfolge in die jeweilige Vertiefung des Mikrotiterstreifens.
- Schwenken Sie die Mikrotiterplatte leicht, dann decken Sie die Mikrotiterplatte zu und inkubieren diese für **10 Minuten bei Raumtemperatur (20–25°C)**.

8.2. WASCHEN – SORGFÄLTIG und STRIKT NACH ANLEITUNG!

WASCHEN PER HAND

- Entsorgen Sie das Inkubat durch Ausleeren in einen Abfallbehälter mit Hypochlorit. Gemäß den behördlichen Vorschriften entsorgen!
- Klopfen Sie die Mikrotiterplatte mehrmals auf einem saugfähigen Papier/Labortuch aus.
- Waschen Sie 4× mit jeweils 300 µl Waschpuffer pro Vertiefung.
- **Zwischen jedem Waschgang komplett entleeren und dann sorgfältig mehrmals auf einer trockenen, unbenutzten Stelle ausklopfen!**

WASCHEN PER WASCHAUTOMAT

- **ACHTUNG:** Proben mit Partikeln sollten vor dem ersten Waschschrift manuell durch Ausklopfen aus den Vertiefungen entfernt werden (Verstopfungsgefahr der Waschnadeln).
- Korrekte Einstellung des Automaten beachten!
- Zur Erzielung optimaler Waschergebnisse mindestens 300 µl Waschpuffer pro Kavität und Waschschrift.
- Komplettes Absaugen der Flüssigkeit nach jedem Waschschrift.
- Nach letztem Waschschrift Platte gründlich auf saugfähigem Papier/Labortuch ausschlagen! Es sollte keine Restfeuchtigkeit in den Kavitäten zurückbleiben!

8.3. ZWEITE INKUBATION

- Geben Sie je **100 µl des Konjugats** in jede Vertiefung der Mikrotiterplatte.
- Schwenken Sie die Mikrotiterplatte leicht, dann decken Sie die Mikrotiterplatte zu und inkubieren diese für **10 Minuten bei Raumtemperatur (20–25°C)**.

8.4. WASCHEN

Waschen wie in Punkt 8.2.

8.5. DRITTE INKUBATION

- Geben Sie **100 µl Substrat (TMB)** in jede Vertiefung.
- Decken Sie die Mikrotiterplatte zu und inkubieren Sie für **5 Minuten bei Raumtemperatur (20–25°C)** und **im Dunkeln**.

8.6. STOPPEN

- Geben Sie **100 µl Stopplösung** in jede Vertiefung.

8.7. MESSUNG

- Nach vorsichtigem Mischen (leichtes Antippen an den Plattenrand) wird die Extinktion innerhalb 30 Minuten nach Zugabe des Stopp-Reagenz bei 450 nm gemessen. Eine zusätzliche Messung in der Referenzwellenlänge 620 nm wird empfohlen.
- Der Abgleich des Nullwertes sollte gegen die Substrat-Leerwertbestimmung erfolgen. Sollte dies aus technischen Gründen nicht möglich sein, ziehen Sie bei der Auswertung die Extinktion dieser Vertiefung von allen anderen Extinktionswerten ab, um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten.
- Falls Doppel- oder Mehrfachbestimmungen durchgeführt wurden, den Mittelwert der Extinktionswerte berechnen.

9. TESTAUSWERTUNG

9.1. REAGENZIENSTABILITÄT – INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

Bei jeder Testung sollten Positiv- und Negativkontrolle mitgeführt werden, um die Stabilität der Reagenzien sowie die korrekte Testdurchführung sicherzustellen.

Der Test war korrekt, wenn folgende Richtwerte erreicht wurden:

- **Positivkontrolle** Extinktion > 0,8
- **Negativkontrolle** Extinktion < 0,1

Eine Abweichung von den geforderten Werten kann ebenso wie eine Trübung oder Blaufärbung des farblosen Substrates vor Zugabe in die Vertiefungen ein Hinweis auf einen Reagenzienverfall sein. Sollten die vorgegeben Werte nicht erfüllt sein, ist vor einer Testwiederholung folgendes zu prüfen:

- Haltbarkeit der verwendeten Reagenzien
- Funktionsfähigkeit der eingesetzten Geräte (Kalibrierung)
- Visuelle Kontrolle der Testkitkomponenten auf Kontamination oder Undichtigkeit; eine bläulich verfärbte Substratlösung darf nicht mehr verwendet werden.

9.2. AUSWERTUNG DER TESTERGEBNISSE

- Cut-off Werte:

Positiver Cut-off = Extinktion (Negativkontrolle) + 0,28

Negativer Cut-off = Extinktion (Negativkontrolle) + 0,2

Positives Testergebnis

Probe, deren Extinktionswert höher als der positive Cut-off ist.

Grenzwertiges Testergebnis

Probe, deren Extinktionswert zwischen den beiden Cut-offs liegt. In diesem Fall wird empfohlen, den Test nach 3–4 Wochen mit einer neuen Probe zu wiederholen. Sollte keine Serokonversion vorliegen und die Extinktion ist nicht höher als der positive Cut-off, sollte die Probe als negativ betrachtet werden.

Negatives Testergebnis

Probe, deren Extinktionswert niedriger als der negative Cut-off ist.

9.3. INTERPRETATION DER TESTERGEBNISSE

- Die Interpretation des abgelesenen Testergebnisses sollte im Rahmen der Anamnese, Klinik, Therapie- und Prophylaxemöglichkeiten betrachtet werden.

MegaELISA® FIV = NEGATIV

→ Fehlen von FIV-Antikörpern

- nicht infizierte Katze
- infizierte Katze im Initialstadium (fehlender Titeranstieg Ø bis zu 4 Wochen [ca. 95%], aber auch bis zu 1 Jahr post infectionem)
- Katze im Terminalstadium (inadäquate Antikörperbildung → Konzentration unter der Nachweisgrenze des Tests).

MegaELISA® FIV = einmalig POSITIV

→ Vorhandensein von FIV-Antikörpern

- infizierte, virämische Katze (> 6 Monate)
- Katzenwelpen jünger als 6 Monate (maternale Antikörper!)

→ bei Titration der Probe

- der Antikörper-Titer der getesteten Probe entspricht der höchsten Verdünnungsstufe, bei der die gemessene Extinktion höher als der positive Cut-off ist.

10. LEISTUNGSMERKMALE

10.1. EINSCHRÄNKUNGEN DES TESTS

- Bakterielle Kontamination oder wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Probe können die Extinktionswerte beeinflussen.
- Die Diagnose einer Infektionserkrankung sollte nicht aufgrund eines einzelnen Tests gestellt werden. Eine konkrete Diagnose sollte sowohl Klinik, Symptomatik als auch serologische Daten berücksichtigen.

11. SICHERHEITSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

- Tragen von Schutzkleidung (Einmal-Handschuhe) und Händewaschen nach Ende der Testdurchführung.
- Essen und Trinken während der Testdurchführung verboten.
- Das Probenmaterial und die Kontrollen müssen als potentiell infektiös angesehen werden und sind mit den verwendeten Testkitkomponenten nach der Testdurchführung fachgemäß zu entsorgen.
- Keine Reagenzien anderer Hersteller zusammen mit den Reagenzien dieses Testkits verwenden.
- Keine Reagenzien unterschiedlicher Chargen zusammen verwenden.
- Verschlusskappen der einzelnen Reagenzien nicht untereinander vertauschen.
- Flaschen nach Gebrauch sofort fest verschließen, um Verdunstung und mikrobielle Kontamination zu vermeiden.
- Nach dem ersten Öffnen Reagenzien-Fläschchen vor weiterem Gebrauch auf mikrobielle Kontamination prüfen.
- Substratlösung enthält Wasserstoffperoxid. **Eine Berührung mit der Haut oder Schleimhaut ist unbedingt zu vermeiden!**
- Nur saubere Pipettenspitzen, Dispenser und Labormaterialien verwenden.
- Niemals mit dem Mund pipettieren!
- Beschriften Sie Probenmaterial und zugehöriges Probenröhrchen, damit die exakte Zuordnung gewährleistet ist.
- Für jede Probe ein neues Probenröhrchen verwenden.
- Während der Inkubations- und Waschschriffe müssen die Vertiefungen vollständig mit Flüssigkeit bedeckt sein.
- Zur Vermeidung von Kreuzkontamination und falsch erhöhten Testergebnissen Patientenproben und Konjugat sorgfältig in die Vertiefungen pipettieren.
- Der **MegaELISA® FIV** ist nur für die Anwendung durch Fachpersonal vorgesehen, das die Arbeitstechniken einwandfrei beherrscht.

Die Testdurchführung, die Information, die Sicherheitsmaßnahmen und Warnhinweise in der Gebrauchsanweisung sind strikt zu befolgen. Bei Anwendung des Testkits auf Diagnostika-Geräten ist die Testmethode zu validieren. Jede Änderung am Aussehen, der Zusammensetzung und der Testdurchführung sowie jede Verwendung in Kombination mit anderen Produkten, die der Hersteller nicht autorisiert hat, ist nicht zulässig; der Anwender ist für solche Änderungen selbst verantwortlich. Der Hersteller haftet nicht für falsche Ergebnisse und Vorkommnisse, die mit diesen Gründen in Zusammenhang stehen. Auch für falsche Ergebnisse aufgrund falscher visueller Auswertung wird keine Haftung übernommen.

12. HAFTUNG

Das gesamte Haftungsrisiko im Zusammenhang mit der Verwendung dieses Produktes liegt beim Käufer. Der Hersteller übernimmt keine Haftung für indirekte, spezielle oder daraus folgende Schäden jeglicher Art, die aus der Benutzung, Testdurchführung und -auswertung dieses Produktes resultieren.

13. KURZ-PROTOKOLL MegaELISA® FIV

TESTVORBEREITUNG

Benötigte Mikrotiterstreifen und Reagenzien auf **Raumtemperatur (20–25°C)** bringen.

Waschpuffer 1:10 mit destilliertem Wasser **verdünnen**.

Proben 1:200 mit PVP **verdünnen** (5 µl Probe + 995 µl PVP).

TESTDURCHFÜHRUNG

Je **2× 100 µl Positiv- und Negativkontrolle**
bzw. **100 µl verdünnte Plasma- oder Serumproben**
in je eine Vertiefung pipettieren.

Zugedeckt **10 Minuten bei Raumtemperatur (20–25°C)** inkubieren.

4× mit je **300 µl 1× Waschpuffer waschen**.

Je **100 µl Konjugat**
in jede Vertiefung pipettieren. Vorsichtig mischen.

Zugedeckt **10 Minuten bei Raumtemperatur (20–25°C)** inkubieren.

4× mit je **300 µl 1× Waschpuffer waschen**.

Je **100 µl Substrat (TMB)**
in jede Vertiefung pipettieren. Vorsichtig mischen.

Zugedeckt **5 Minuten bei Raumtemperatur (20–25°C)**
im Dunkeln inkubieren.

Je **100 µl Stopp-Reagenz**
in jede Vertiefung pipettieren.

Photometrische Auswertung der Vertiefungen bei 450 nm.

1. INTRODUCTION

The Feline Acquired Immunodeficiency Syndrome (FAIDS), caused by the Feline Immunodeficiency Virus (FIV), is distributed world-wide in felids. Prevalences can vary in a wide range due to keeping conditions (stray cats, day release cats) from 2–3 % in Germany up to over 30 % in Italy and 44 % in Japan.

Infection with FIV containing body fluids, blood or blood components normally goes parenteral (through bite injuries, blood transfusions, mating with following neck bite) as well as by transplacental and perinatal transmission into the blood of healthy cats. Free-roaming tomcats with strong territorial behaviour are regarded as “risk animals” with significantly higher infection rates.

The initial stage of infection (enlarged lymph nodes, pyrexia, neutropenia etc.) often remains unnoticed. The following lag period usually is asymptomatic over years. Only then, first specific symptoms become apparent, predominantly caused by the diverse secondary symptoms (e.g. stomatitis, tumour diseases, anaemia and leukopenia), to a lesser extent by the virus itself (e.g. neurological symptoms, lymphomas).

Due to the more or less asymptomatic initial phase and latent period and the fact that nearly 95 % of the FIV infected cats show high FIV antibody levels 4 weeks post infection, the detection of FIV antibodies plays an important role as routine method of choice for the diagnosis of a potential FIV infection.

Based on highly specific and synthetic FIV proteins, **MegaELISA® FIV** is an important diagnostic tool for the diagnostic evaluation of clinical as well as anamnestic FIV suspicious cats.

2. INTENDED USE

MegaELISA® FIV is an enzyme immunoassay for the qualitative detection of antibodies against the Feline Immunodeficiency Virus (FIV) in plasma or serum of the cat.

3. TEST PRINCIPLE

The **MegaELISA® FIV** is a qualitative immunoassay to detect antibodies against the Feline Immunodeficiency Virus (FIV) using a sandwich principle.

Synthetic FIV antigens are bound to the surface of the well in the ELISA plate. A dilution of the cat plasma or serum to be tested as well as the controls are incubated in a first step at room temperature (20–25 °C) in the wells of the ELISA plate. After a wash step, anti-cat conjugate labelled with horse radish peroxidase (HRP) is added and incubated at room temperature (20–25 °C). Non-bound conjugate is removed in another wash step. After addition of Substrate (Tetramethylbenzidine [TMB]), with positive samples, the bound enzyme changes the colourless solution in the wells of the ELISA plate into a blue solution. By addition of Stop solution (Sulfuric acid), the colour changes from blue to yellow. The extinction is proportional to the concentration of the antibodies against FIV present in the sample.

4. TEST-KIT COMPONENTS

4.1. COMPONENTS / REAGENTS PROVIDED WITH THE TEST-KIT

The reagents of one package are sufficient for 96 determinations.

1. **ELISA plate with 96 determinations** (12 separable test strips with 8 determinations each, in holding frame), coated with synthetic FIV antigens
2. **100 ml Sample dilution buffer SDB**, ready to use, **purple cap**
3. **60 ml Wash buffer (10×)**, **blue cap**
4. **4 ml Positive Control**, ready to use, **transparent cap with red dot**
5. **4 ml Negative Control**, ready to use, **transparent cap with blue dot**
6. **15 ml Conjugate** (peroxidase-conjugated antibodies against cat antibodies), ready to use, **blue cap**
7. **15 ml Substrate** (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine [TMB]/hydrogen peroxide [H_2O_2]), ready to use, **brown bottle, brown cap. Do not expose to sun light!**
8. **15 ml Stop solution** (0.2 M Sulfuric acid), ready to use, **white cap**
9. **1 Evaluation sheet**
10. **1 Cover foil**
11. **1 Instructions for use**

4.2. REQUIRED, NON-PROVIDED REAGENTS / DEVICES

- Distilled or deionised water
- Vortex mixer
- Filter paper/laboratory cloths
- Measuring cylinder (1000 ml)
- Stop watch
- Washing station for ELISA plates or multichannel pipette (300 μ l)
- Photometer for ELISA plates (450 nm, reference filter 620 nm)
- Waste bin with a 0.5% hypochlorite solution

5. STABILITY AND STORAGE



Store at
2–8°C



Expiry date
– see label



For veterinary use
only



Lot number



In vitro diagnosticum



Do not use test-kit
components from
different kits, lot
numbers or beyond
stated expiry date.



Follow instructions for
use precisely

Microbial contamination must be avoided. After the expiration date, the guarantee of quality is not provided.

Remove the required amount of ELISA strips, place the remaining strips in the bag provided, close the bag and store it at 2–8°C.

A direct influence of light onto the Substrate must be absolutely avoided to prevent degradation/autooxidation/colour change to blue. If the Substrate colour has changed to blue, it cannot be used any more (functional incapacity).

6. INFORMATION ON THE SAMPLE MATERIAL

- Use only cat plasma or serum samples!
- Mix the sample material well before use!
- Non-cooled (20–25°C), plasma or serum should be tested within 4 hours! At 2–8°C, the plasma or serum can be stored up to 5 days. Plasma or serum samples can be aliquoted and permanently stored at minimum –20°C. Avoid repeated freezing and thawing.
- Some lipaemic or haemolytic samples can cause a background colour. In such cases, it is recommended to repeat the test with better quality samples.
- Keep in mind that the sample material, as well as all used test-kit components, should have reached room temperature at the time of application.
- **ATTENTION:** Partially filled and/or insufficient mixed EDTA, Citrate or Heparin tubes could create interference effects resulting in varying test results.

7. TEST PREPARATION



Read instructions for use carefully before starting the test. For the reliability of the results, it is important to follow the instructions for use exactly as described. Carry out the test in the given order and without delay. Use clean disposable tips for each pipetting step.

7.1. GENERAL

- Remove the test strips from the pouches after they have reached room temperature. To avoid loss by evaporation, it is advisable to cover or mask them.
- Mix the reagents well immediately before their use.
- After use, both non-used test strips (in closed plastic pouch) and reagents should be stored at 2–8°C again.
- Test strips that were once used cannot be used again.
- Damaged test-kit components must not be used.
- Direct contact of samples with the test-kit components has to be avoided (cross-contamination).
- Direct solar radiation during testing must be avoided.

7.2. PREPARATION OF WASH BUFFER 1:10

Mix 1 part (60 ml) of the Wash buffer concentrate with 9 parts (540 ml) of distilled water. When crystals are visible in the Wash buffer concentrate, dissolve these by warming the Wash buffer concentrate up to 37°C in a water bath. The diluted buffer will be stable for one year if stored at 2–8°C.

7.3. SAMPLE PREPARATION / SAMPLE DILUTION 1:200 OR 1+199

- Plasma and serum has to be diluted for testing 1:200 with SDB, e. g. 5 µl sample + 995 µl SDB.
- Homogenise the sample-buffer mixture (SBM) well (repeated mixture with pipette or vortex mixer).
- **ATTENTION:** During the use of an ELISA washing station, the SBM must be free of particles! To guarantee this, please centrifuge the SBM with 5000 rpm for 5 minutes.
- For titration, serial dilution should start at a 1:200 dilution.
- Controls are ready for use and need not to be diluted.

8. TEST PROCEDURE

- Mix sample material (SBM) and conjugate well before application!
- Before beginning, the position of the patient samples and the standards/controls in the microtitre plate must be determined on the result sheet supplied with the kit. At least duplicates are recommended.
- Use clean pipette tips for each pipetting step.

8.1. SAMPLING AND FIRST INCUBATION

- Place the required amount of test strips into the holding frame.
- Add
 - **100 µl of Positive Control (2×)**
 - **100 µl of Negative Control (2×)**
 - **100 µl of diluted sample / SBM (2×)**each in the desired order into the particular cavity of the test strip.
- Shake the ELISA plate gently, cover it and incubate for **10 minutes at room temperature (20–25°C)**.

8.2. WASHING – CAREFULLY and STRICTLY FOLLOWING THE INSTRUCTIONS!

MANUAL WASHING

- Remove the incubation solution by emptying into a waste bin with hypochlorite. Disposal must be made according to official regulations!
- Beat the ELISA plate carefully several times onto filter paper/laboratory cloth.
- Wash 4× with 300 µl Wash buffer per cavity.
- **Drain completely between each wash step, then beat carefully several times on a dry unused spot!**

AUTOMATICAL WASHING

- **ATTENTION:** Samples still containing any particles should be manually removed from the cavities by shaking off (danger of blockage of the washing needles).
- Observe correct setting of the washing station!
- To reach optimal washing results use at least 300 µl Wash buffer per cavity and wash step.
- Aspire liquid completely after each wash step.
- After the final wash step, beat the plate carefully but thoroughly on filter paper/laboratory cloth! There should not be any residual moisture in the cavities!

8.3. SECOND INCUBATION

- Add **100 µl of Conjugate** into each cavity of the test strip.
- Shake the ELISA plate gently, cover it and incubate for **10 minutes at room temperature (20–25°C)**.

8.4. WASHING

Wash as described in issue 8.2.

8.5. THIRD INCUBATION

- Add **100 µl of Substrate (TMB)** into each cavity of the test strip.
- Cover the ELISA plate and incubate for **5 minutes at room temperature (20–25°C)** and **in the dark**.

8.6. STOP

- Add **100 µl of Stop solution** into each cavity of the test strip.

8.7. MEASUREMENT

- After careful mixing (tipping softly at the plate rim), the extinction can be measured at 450 nm within 30 minutes after addition of the Stop solution. An additional measurement at the reference wavelength 620 nm is recommended.
- Adjust the ELISA Plate Reader to zero using the Substrate Blank. If – due to technical reasons – the ELISA Plate Reader cannot be adjusted to zero using the Substrate Blank well, subtract the extinction value of this well from all other extinction values measured in order to obtain reliable results!
- If duplicates or multiple determinations were done, calculate the mean absorbance of the extinction values.

9. TEST EVALUATION

9.1. REAGENT STABILITY – INTERNAL QUALITY CONTROL

During each testing, Positive and Negative Controls should be performed to ensure the stability of reagents as well as the correct test procedure.

The test was correct, when following reference values were reached:

- **Positive Control** Extinction > 0.8
- **Negative Control** Extinction < 0.1

A variation of the required values as well as any clouding or blue staining of the colourless Substrate before adding into the cavities can be a hint on expiry of reagents. If following issues are not fulfilled, following should be ensured before test repetition:

- Stability of the used reagents
- Functionality of the used machines (calibration)
- Visual control of the test-kit components for contamination or leakage; a blueish stained Substrate solution should not be used.

9.2. EVALUATION OF THE TEST RESULTS

- Cut-off values:
Positive Cut-off = extinction (Negative Control) + 0.28
Negative Cut-off = extinction (Negative Control) + 0.2

Positive test result

Sample with an extinction higher than the positive Cut-off.

Marginal test result

Sample with an extinction in the field between both Cut-offs. In this case it is recommended to repeat the test after 3–4 weeks with a new sample. If there is no seroconversion and the extinction is not higher than the positive Cut-off, the sample should be considered negative.

Negative test result

Sample with an extinction lower than the negative Cut-off.

9.3. INTERPRETATION OF THE TEST RESULTS

- The interpretation of the test result should always be based on anamnestic and clinical data as well as the therapy and prophylaxis possibilities.

MegaELISA® FIV = NEGATIVE**→ lack of FIV antibodies**

- non-infected cat
- infected cat in initial phase of infection (absent titre increase Ø up to 4 weeks (ca. 95%), but also up to 1 year post infection)
- cat in terminal phase (inadequate antibody production → concentration below detection limit of the test).

MegaELISA® FIV = single POSITIVE**→ presence of FIV antibodies**

- infected, viraemic cat (> 6 months)
- kitten younger than 6 months (maternal antibodies!)

→ titration of the sample

- the antibody titre of the tested sample corresponds to the highest dilution at which the measured extinction is higher than the positive Cut-off.

10. FEATURES OF PERFORMANCE**10.1. LIMITATIONS OF THE TEST PROCEDURE**

- Bacterial contamination or repeated freeze-thaw cycles of the specimen may affect the extinction values.
- Diagnosis of an infectious disease should not be established on the basis of a single test result. A precise diagnosis should take into consideration clinical history, symptomatology as well as serological data.

11. SAFETY MEASURES AND PRECAUTIONS

- Wear safety clothes (disposable gloves) and wash the hands after finishing the test procedure.
- No eating and drinking during test procedure.

- The sample material and Controls must be seen as potentially infectious and disposed of accordingly, together with the used test-kit components.
- Do not use reagents of other manufacturers together with the reagents of this test-kit.
- Do not mix reagents of different Lot numbers.
- Do not change the caps of the individual reagents among each other.
- Close bottles immediately after use to avoid evaporation and microbial contamination.
- After first opening, the reagent bottles must be checked for microbial contamination before reusing.
- Substrate solution contains hydrogen peroxide. **Absolutely avoid skin or mucosa contact!**
- Only use clean pipette tips, dispenser and laboratory material.
- Never pipet with your mouth!
- Label sample material and associated sample tube to ensure a precise assignment.
- Use a new sample tube for each sample.
- During the incubation and wash steps, the cavities must be completely covered with liquid.
- To avoid cross contamination and falsely elevated test results, pipet the patient samples and conjugate carefully into the cavities of the ELISA plate.
- **MegaELISA® FIV** is only provided for the use of qualified staff that knows the work technique objectionable.

The test procedure, the information, the safety measures and warnings in the Instructions for use are to be followed strictly. For use of the test-kit in diagnostical instruments, the test method has to be validated. Each change in appearance, composition and the application as well as each use in combination with other products not authorised by the manufacturer is not permitted. The manufacturer is not liable for false results and incidents being associated herewith. The user himself is responsible for such changes. No liability is accepted for false test results due to false visual evaluation.

12. LIABILITY

The entire risk due to the performance of this product is assumed by the purchaser. The manufacturer shall not be liable for indirect, special or consequential damages of any kind resulting from the use of this product.

13. SHORT PROTOCOL MegaELISA® FIV

TEST PREPARATION

Warm needed test strips and reagents to **room temperature (20–25°C)**.

Dilute Wash buffer 1:10 with distilled water.

Dilute samples 1:200 with SDB (5 µl sample + 995 µl SDB).

TEST PROCEDURE

Add **2× 100 µl of Positive and Negative Controls**
or **100 µl of diluted plasma or serum samples** each
in a cavity.

Cover and incubate **10 minutes at room temperature (20–25°C)**.

Wash 4× with **300 µl 1× Wash buffer** each.

Add **100 µl of Conjugate**
in each cavity. Mix carefully.

Cover and incubate **10 minutes at room temperature (20–25°C)**.

Wash 4× with **300 µl 1× Wash buffer** each.

Add **100 µl of Substrate (TMB)**
in each cavity. Mix carefully.

Cover and incubate **5 minutes at room temperature (20–25°C)**
in the dark.

Add **100 µl of Stop solution**
in each cavity.

Photometric evaluation of the cavities at 450 nm.

FÜR EIGENE NOTIZEN / FOR YOUR OWN NOTES

FÜR EIGENE NOTIZEN / FOR YOUR OWN NOTES

FÜR EIGENE NOTIZEN / FOR YOUR OWN NOTES